

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

RNA HELIKAZE

RNA HELICASES

SEMINARSKI RAD

Alen Kovačević

Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor: doc. dr. sc. Ivana Ivančević Bašić

Zagreb, 2012.

SADRŽAJ

1. UVOD	2
2. STRUKTURA RNA HELIKAZA S DEAD DOMENOM	4
3. BIOKEMIJSKE KARAKTERISTIKE I MEHANIZAM DJELOVANJA	7
4. ULOGA ATP-a.....	9
5. ULOGE RNA HELIKAZA	11
5.1. Uloga eIF4A u inicijaciji translacije	11
5.2. Uloga Dbp5 u transportu mRNA iz jezgre u citoplazmu.....	13
6. LITERATURA	15
7. SAŽETAK	16
8. SUMMARY	16

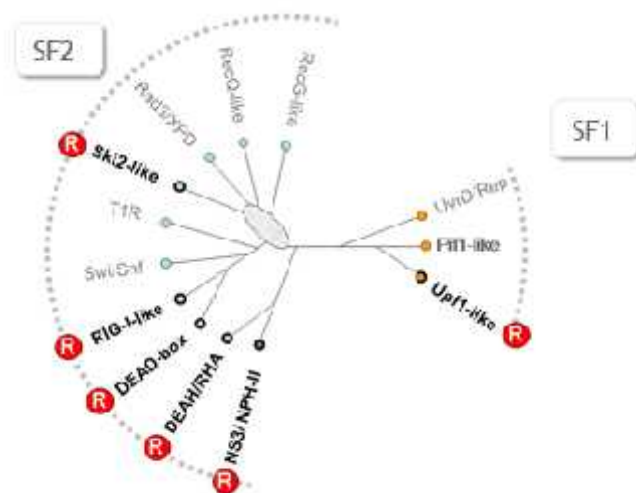
1. UVOD

RNA predstavlja vrlo značajnu i nezaobilaznu kariku centralne dogme molekularne biologije. Osim samog procesa sinteze proteina uključena je u pre-mRNA i tRNA procesiranje, regulaciju genske ekspresije pa i unutarstanični promet proteina. Poznate su i brojne nekodirajuće RNA molekule sa širokim rasponom uloga i mehanizama djelovanja. Za uspješno izvršenje svoje funkcije u stanici, moraju postići određenu terciarnu strukturu u čemu im pomažu RNA šaperoni. U zadnjih nekoliko godina intenzivno se istražuje skupina proteina s DEAD domenom unutar koje postoje enzimi sa šaperonskom pa i RNA helikaznom aktivnošću. U brojnim staničnim procesima RNA helikaze igraju važnu ulogu u vezanju, razdvajanju i remodeliranju ribonukleoproteinskih kompleksa (u daljnjem tekstu RNP) i dvolančanih RNA molekula (Pan i Russell, 2010).

RNA helikaze su uključene u sve faze RNA metabolizma počevši od transkripcije i translacije pa sve do razgradnje RNA, biogeneze ribosoma i nekih vrlo specifičnih funkcija kao što su formiranje RISC kompleksa. Prisutne su u sve tri domene života te u brojnim virusima (Linder i Jankowsky, 2011).

RNA helikaze su srodne DNA helikazama koje su uključene u procese replikacije, rekombinacije i popravka DNA. Zajedno, DNA i RNA helikaze dijele se na one koje imaju i one koje nemaju prstenastu strukturu te su klasificirane u 6 nadporodica (SF 1-6, od *eng. superfamilies*). SF1 i SF2 su nadporodice koje nemaju prstenastu strukturu i karakteristične su po tome što sadrže dvije gotovo identične RecA proteinu slične domene (Sl. 1). RNA helikaze su prisutne u svih 6 nadporodica, a u ovom radu naglasak je na eukariotskim RNA helikazama s DEAD domenom iz SF2 (Jankowsky, 2011).

Proteini s DEAD domenom velika su proteinska obitelj s visoko konzerviranim aminokiselinskim sekvencama. Naziv su dobili po konzerviranom slijedu u srži enzima: Asp-Glu-Ala-Asp (DEAD). Djeluju kao dio većih proteinskih kompleksa (npr. kompleksa za inicijaciju translacije kod eukariota) te u ovisnosti o ATP-u razdvajaju dRNA, odvajaju RNA od proteina, pomažu u smatanju RNA ili remodeliraju sekundarnu strukturu RNA. Mutacija jednog od ovih enzima vodi do pojave bolesti organizma, uključujući i rak. Biokemijska, biofizička te strukturna istraživanja nastoje odgovoriti na pitanje kako ovako visoko konzervirani proteini uspjevaju obavljati širok raspon zadataka u stanici (Linder i Jankowsky, 2011).



Slika 1. Podijela SF1 i SF2 na porodice.

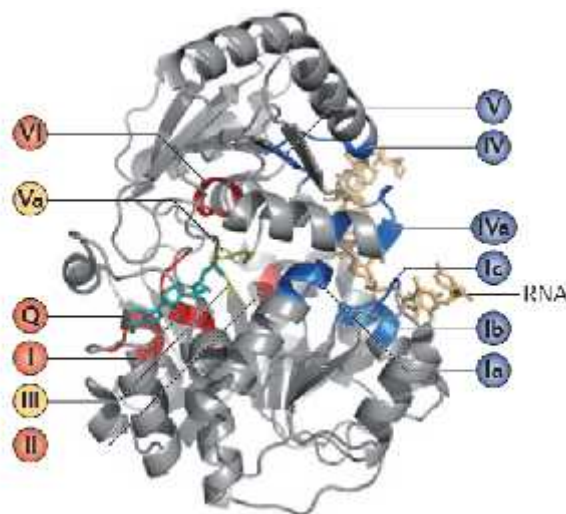
(RNA helikaze prisutne u porodicama označene slovom R)

(preuzeto s <http://www.rnahelicase.org>)

2. STRUKTURA RNA HELIKAZA S DEAD DOMENOM

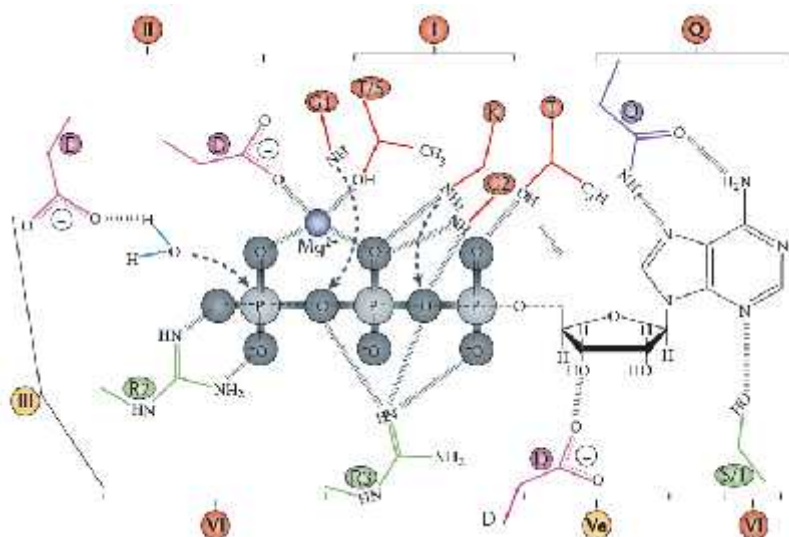
Baš kao svi proteini iz druge helikazne nadporodice (SF2), RNA helikaze s DEAD domenom sadrže visoko konzerviranu srž okruženu s brojnim drugim domenama zbog kojih ovi proteini mogu imati različite funkcije. Srž sadrži barem 12 motiva s karakterističnim aminokiselinskim sekvencama na točno određenim položajima. Cijela skupina proteina dobila je naziv po ponavljajućoj sekvenci iz motiva II: Asp-Glu-Ala-Asp (DEAD).

Motivi u srži organizirani su u dvije domene slične bakterijskim RecA proteinima. Kada se gleda terciarna struktura proteina, jasno je da te dvije domene ine rascijep koji predstavlja ATP vezno mjesto nasuprot kojeg je položeno RNA vezno mjesto (Sl. 2). Položaj funkcionalnih skupina određenih aminokiselina je strogo definiran i ključan za uspješno vezanje i hidrolizu ATP-a (Sl. 3). Na primjer, u motivu II bitan je položaj glutamata zaduženog za pravilno pozicioniranje molekule vode ključne u procesu hidrolize ATP-a i položaj aspartata bitnog za koordinaciju iona magnezija (ostale interakcije prikazane su na Sl. 3).



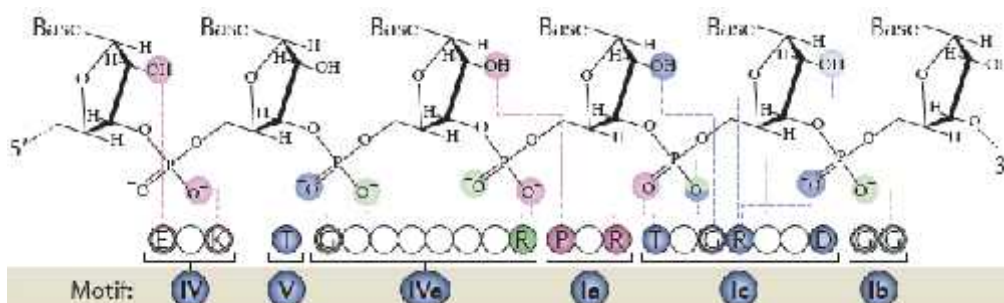
Slika 2. Struktura srži RNA helikaza s DEAD domenom s konzerviranim sekvencama (motivi IV, V, Va, VI u domeni 1, te motivi Q, I, Ia, Ib, Ic, II, III u domeni 2; crvenom bojom označeni su motivi bitni za vezanje i hidrolizu ATP-a, a plavom motivi za vezanje RNA)

(preuzeto iz Linder i Jankowsky, 2011)



Slika 3. Aminokiselinski bo ni ogranci bitni za vezanje i hidrolizu ATP-a
(preuzeto iz Linder i Jankowsky, 2011)

Vežanje RNA tako er zahtijeva odre eni stupanj konzerviranosti aminokiselinskih sekvenci. Molekula RNA se prilikom vezanja na RNA helikaze s DEAD domenom savija na vrlo specifi an na in i postiže komformaciju razli itu od nukleinskih kiselina vezanih na druge helikaze iz nadporodica SF1 i SF2. U interakciju s funkcionalnim skupinama enzima uklju eno je 5 nukleotida RNA i to samo preko 2' OH skupina riboze i negativno nabijenih fosfatnih skupina koje povezuju dva susjedna nukleotida (Sl. 4) (Linder i Jankowsky, 2011). Ove interakcije ne objašnjavaju vezanje helikaze na specifi nu nukleotidnu sekvencu, no injenica da je potrebno nekoliko interakcija s 2' OH skupinama riboze upu uje na mehanizam razlikovanja RNA od DNA molekula (Jarmoskaite i Russell, 2011).



Slika 4. Aminokiseline i motivi klju ni za vezanje RNA
(prilago eno na temelju Linder i Jankowsky, 2011)

Komunikacija između ATP i RNA veznog mjesta nije do kraja istražena. Smatra se da bi u tome mogli biti uključeni motivi III i IV.

Većina RNA helikaza s DEAD domenom u helikaznoj srži ne posjeduju druge domene osim dvije prethodno navedene. Njihova struktura podsjeća na RecA. Izuzetak su DDX24 i DDX1 prisutne u sisavcima (Linder i Jankowsky, 2011).

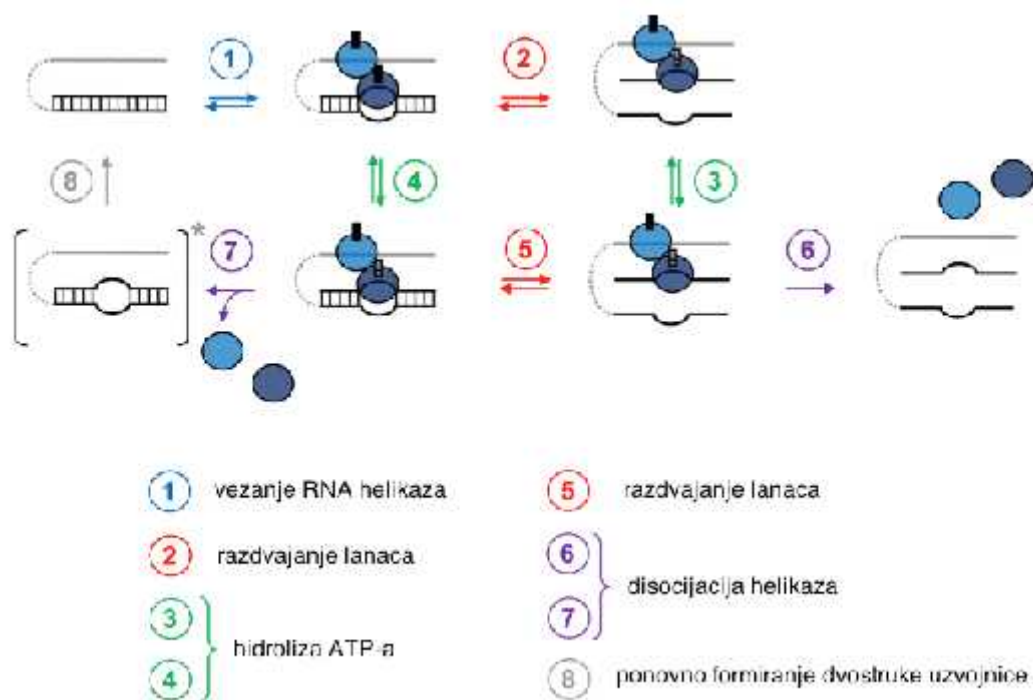
3. BIOKEMIJSKE KARAKTERISTIKE I MEHANIZAM DJELOVANJA

Proteini s DEAD domenom vezanjem ATP-a uspješno razdvajaju lance dvolan anih RNA molekula te RNA-DNA heteroduplekse. Okarakterizirani su kao slabe helikaze. Njihova procesivnost je jako malo, a uspješno mogu razdvojiti lance duljine 10 – 15 parova baza. Na uspješnost razdvajanja lanaca utje e i stabilnost uzvojnice. Na primjeru eIF4A (RNA helikaza kod sisavaca) pokazano je da je uspješnost razdvajanja lanaca bogatih G-C baznim parovima jako smanjena. Jednolan ani produžeci na 3' ili 5' kraju dvostruke uzvojnice stimuliraju razdvajanje lanaca brojnim DEAD RNA helikazama.

Sam mehanizam se uveliko razlikuje od mehanizama drugih helikaza – translokacija proteina po lancu prilikom razdvajanja se ne doga a, nego se lanci razdvajaju tzv. mehanizmom lokalnog razdvajanja (Sl. 5) (Jarmoskaite i Russell, 2011).

Proces razdvajanja lanaca zapo inje direktnim vezanjem helikaza na dvolan ane uzvojnice. Vezanje je naj eš e potpomognuto postojanjem jednolan anih regija RNA u blizini mjesta razdvajanja i može se dogoditi na bilo kojem dijelu dvostruke uzvojnice. Prilikom vezanja helikaze na supstrat dolazi do lokalnog razdvajanja lanaca. Da bi se to dogodilo potrebno je vezanje ATP-a na helikazu. Nakon što se dogodilo razdvajanje prvih nekoliko parova baza prilikom samog vezanja helikaza, ostatak uzvojnice se spontano razdvoji bez dodatnog djelovanja enzima. Nakon potpunog razdvajanja, hidrolizom ATP-a mijenja se afinitet helikaze i ona disocira sa sada razdvojenih jednolan anih molekula RNA. Ukoliko je supstrat bila dulja i stabilnija dvolan ana molekula, hidroliza ATP-a se može dogoditi prije nego se lanci razdvoje pa helikaza disocira prijevremeno. Tada se govori o neproduktivnoj hidrolizi ATP-a (Jankowsky, 2011).

Iako je do sada poznato da skoro sve RNA helikaze imaju mehanizam lokalnog razdvajanja lanaca, postoje i izuzeci. Kod nekoliko virusnih RNA helikaza iz skupine NS3/NPH-II primje en je mehanizam klasi nog razdvajanja lanaca kakav imaju sve DNA helikaze. Taj mehanizam uklju uje vezanje potpomognutno ATP-om te translokaciju od jednog ka drugom kraju dvostruke uzvojnice (3' prema 5' ili obrnuto). Prilikom te translokacije uklanja se komplementarni lanac. Ciklus završava hidrolizom ATP-a i disocijacijom helikaze s jednolan ane molekule (Jankowsky, 2011).



Slika 5. Mehanizam lokalnog razdvajanja lanaca

(plavi kruži i predstavljaju RNA helikaze; crni pravokutnik predstavlja ATP, a sivi ADP)

(prilagođeno na temelju Jankowsky, 2011)

4. ULOGA ATP-a

Rješenjem tercijarne strukture srži RNA helikaza s DEAD domenom postalo je jasno da su dvije RecA proteinima slične domene u osnovnom stanju bez supstrata fleksibilne te da se gibaju slobodno jedna u odnosu na drugu. Prilikom vezanja ATP-a i RNA te dvije domene se približavaju jedna drugoj i na taj način zatvaraju srž enzima sa supstratima u aktivnim mjestima te omogućuju razdvajanje lanaca. Iako su fizički razdvojeni, postoji komunikacija između u ATP i RNA veznog mjesta pa u ovisnosti o ciklusu ATP-a možemo govoriti o kooperativnosti vezanja liganada. Oba liganda preferiraju zatvorenu konformaciju srži enzima pa vezanje samo jednog uzrokuje konformacijske promjene koje pospješuju vezanje drugog. Nakon hidrolize ATP-a i disocijacije P_i , kooperativnost opada. Domene srži se udaljavaju, ponovno postaju fleksibilne i enzim otpušta produkt γ RNA. Dakle, interakcija helikaze s γ fosforilnom skupinom ATP-a (Sl. 3) ključna je za održavanje zatvorene strukture srži enzima i povećanje afiniteta helikaze (u ATP vezanom stanju) za dvolančanu RNA (Jarmoskaite i Russell, 2011).

Istraživanja strukture srži, dok je RNA prisutna u svom veznom mjestu, s analozima prijelaznog stanja i analogom osnovnog stanja ATP-a pokazala su da ne postoje nikakve strukturne promjene unutar RNA veznog mjesta, dok su samo male varijacije strukture prisutne u ATP veznom mjestu.

Vezanje ATP-a za srž helikaze igra ključnu ulogu u razdvajanju lanaca. Bez obzira na duljinu lanca, dovoljno je vezanje samo jedne molekule ATP-a da se dogodi uspješno razdvajanje jedne dvolančane molekule RNA. Nakon hidrolize ATP-a i otpuštanja fosfatne skupine afinitet helikaze za γ RNA naglo pada i dolazi do disocijacije enzima. To zapravo znači da je hidroliza ATP-a događaj ključan za obrtanje supstrata.

Bitno je napomenuti da je hidroliza ATP-a brz proces za razliku od samog otpuštanja ADP-a i P_i iz aktivnog mjesta enzima koji zapravo određuju brzinu obrtaja. Osim što je proces hidrolize brz, također je i reverzibilan pa se hidroliza i ponovno formiranje ATP-a mogu ponavljati nekoliko puta. Dakle, prisutnost ATP-a ili $ADP + P_i$ u aktivnom mjestu omogućuje razdvajanje lanaca i kod različitih enzima koordinirano je na različite načine – kod većine RNA helikaza razdvajanje lanaca događa se u trenutku vezanja ATP-a, a kod manjeg broja u trenutku hidrolize. Primjer

za razdvajanje lanaca RNA u trenutku hidrolize ATP-a su bakterijske DbpA (Linder i Jankowsky, 2011).

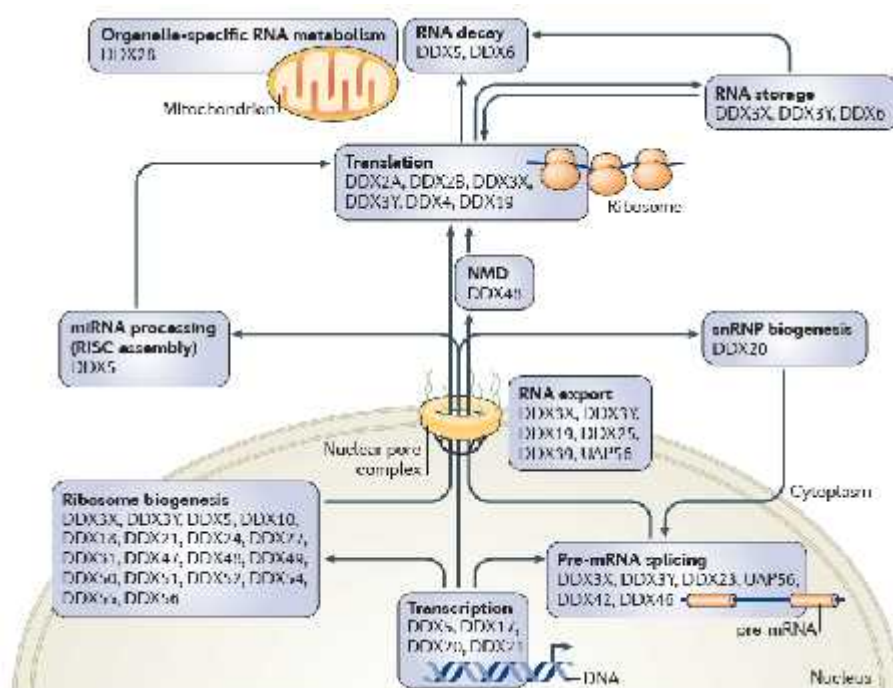
U kona nci cijeli proces može se ukratko prikazati jednađbom:



u kojoj E predstavlja RNA helikazu, a $E \bullet \text{jlRNA1} \bullet \text{ATP}$ me uprodukt nakon uspješnog razdvajanja lanaca (Jarmoskaite i Russell, 2011).

5. ULOGE RNA HELIKAZA

Velik broj do danas poznatih RNA helikaza ima vrlo širok raspon djelovanja u svim fazama RNA metabolizma (Sl. 6). Osim što su zadužene za razdvajanje dvostrukih RNA molekula i RNA-DNA heterodupleksa, mnoge RNA helikaze imaju ulogu u remodeliranju sekundarne strukture RNA, odvajanju RNA iz RNP kompleksa, sparivanju dvaju RNA lanaca te smatanju RNA (kada govorimo o RNA šaperonima). Neki od stanih procesa prikazanih na slici 6, bit će detaljnije opisani u daljnjem tekstu.



Slika 6. Procesi u koje su uključene RNA helikaze s DEAD domenom u eukariotskoj stanici (preuzeto iz Linder i Jankowsky, 2011)

5.1. Uloga eIF4A u inicijaciji translacije

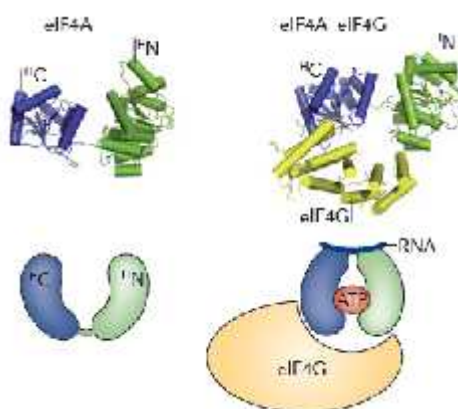
Protein eIF4A predstavlja primjer tipične RNA helikaze s DEAD domenom. Upravo na ovom proteinu rađena su istraživanja kojim su razriježene osnovne biokemijske karakteristike i mehanizmi RNA helikaza (ATP ovisno helikazno djelovanje i RNA remodeliranje).

eIF4A jedan je od najzastupljenijih proteina u mnogim stanicama i uključen je u proces inicijacije translacije (Linder i Jankowsky, 2011). U sisavcima postoje tri

izozima, no samo su eIF4AI i eIF4AII uključeni u inicijaciju translacije. Kod kvasca je ovaj protein kodiran s dva gena, a istovremena inaktivacija oba, za stanicu je letalna. eIF4A jedini je eIF4 faktor koji su homolozi poznati i u arhejama (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6597/#_ncbi_dlg_citbx_NBK6597).

U stanici, eIF4A (uz eIF4G i eIF4E) dio je eIF4F kompleksa koji je zadužen za vezanje 40S podjedinice ribosoma i drugih inicijacijskih faktora na mRNA. eIF4A, kao sve RNA helikaze s DEAD domenom, nije procesivna helikaza i nakon uspješnog razdvajanja dRNA mora biti zamjenjen drugim, slobodnim eIF4A. Osim s proteinima eIF4F kompleksa, eIF4A stupa u interakciju s inicijacijskim faktorima eIF4B i eIF4H koji pospješuju vezanje na mRNA te samim tim povećavaju mogućnost razdvajanja dvolananih RNA regija. Prisutnost ta dva inicijacijska faktora može omogućiti i razdvajanje duljih dRNA (Linder i Jankowsky, 2011).

Kompleks eIF4F, to nije njegova podjedinica eIF4E, igra ulogu u inicijaciji translacije vežući se na 5' 7-metilgvanozinsku kapu (m⁷GpppN). eIF4G dio je kompleksa na koji se vežu eIF4E i eIF4A i na taj način vezu izmještu u mRNA i ribosoma (Svitkin i suradnici, 2001). Biokemijske, biofizičke i strukturne analize su pokazale da je interakcija između eIF4A i eIF4G vrlo bitna za vezanje helikaze eIF4A na mRNA (Sl. 7). Naime, eIF4G posjeduje domenu za vezanje na obe RecA proteinu slične domene eIF4A proteina i to vezanje uzrokuje promjenu konformacije eIF4A iz otvorene u poluzatvorenu, pogodnu za vezanje na mRNA i brže otpuštanje fosfata (što je inače najsporiji korak u ATP ciklusu RNA helikaza).



Slika 7. Struktura slobodnog eIF4A proteina (lijevo) i struktura eIF4A u interakciji s eIF4G (desno)

(prilagođeno na temelju Linder i Jankowsky, 2011)

Ono što se događa nakon vezanja eIF4F kompleksa na mRNA i malu podjedinicu ribosoma, nije baš u potpunosti jasno. Za rješavanje tog problema potrebno je definirati eIF4A vezna mjesta na mRNA. Postoji nekoliko teorija i pretpostavki o tome što se događa prije nego ribosom započne traženje start kodona na mRNA. Prvo se smatralo da eIF4A raspliće sekundarnu strukturu 5' netranslatirane regije (5' UTR) na mRNA koja koči ribosom, no takvo djelovanje eIF4A nikad nije dokazano te je rasplitanje 5' UTR moguće i u odsutnosti eIF4A helicaze. Umjesto toga, neki znanstvenici predlažu da eIF4A uzrokuje konformacijske promjene u inicijacijskom kompleksu potrebne da bi se počinje translacija dogodio (Linder i Jankowsky, 2011).

5.2. Uloga Dbp5 u transportu mRNA iz jezgre u citoplazmu

Vrlo bitan korak u genskoj ekspresiji predstavlja transport mRNA iz jezgre u citoplazmu. Uspješan izlazak iz jezgre je omogućen prethodnim formiranjem mRNP kompleksa. Na mRNA se veže proteinski heterodimer Mex67/Mtr2 koji navodi mRNA, odnosno sada mRNP, prema kompleksu jezgrine pore (u daljnjem tekstu NPC, od eng. *nuclear pore complex*). Osim što navodi mRNP prema NPC, također mu olakšava i prolaz kroz NPC stvarajući i interakcije s FG-nukleoporinima (proteinima NPC-a koji su bogati s aminokiselinama fenilalanin i glicin).

Na citoplazmatskoj strani NPC-a smješten je protein s DEAD domenom, RNA helicaza Dbp5 kod kvasca (odnosno DDX19 kod čovjeka). Dbp5 može biti lokaliziran u jezgri ili citoplazmi, a na citoplazmatskoj strani NPC-a pri vršenju je direktnom interakcijom s proteinom Nup159. Uloga Dbp5-a je uklanjanje heterodimera Mex67/Mtr2 i mRNA vezujućeg proteina Nab2. Uklanjanjem ovih proteina iz mRNP kompleksa omogućeno je vraćanje mRNA u jezgru te je osiguran isključivo jednosmjerni transport prema citoplazmi.

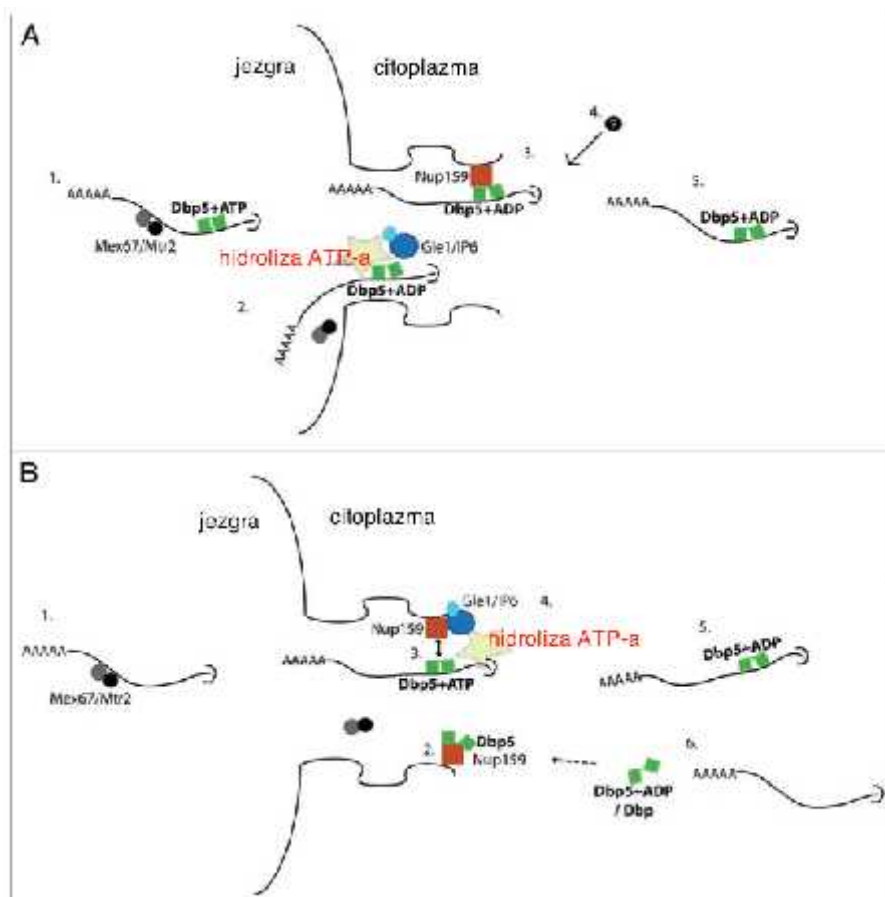
Kao sve RNA helicaze s DEAD domenom i Dbp5 je ovisna o ATP-u. Aktivan oblik ove helicaze u kojem je omogućeno remodeliranje i uklanjanje proteina iz mRNP kompleksa je ADP vezano stanje Dbp5-a. Dbp5 ima vrlo slabu ATP-aznu aktivnost koju je potrebno stimulirati interakcijom s proteinom Gle1 i kofaktorom IP6 koji su također lokalizirani na citoplazmatskoj strani NPC-a.

Strukturne analize Dbp5 koje su otkrile da se vezna mjesta za Nup159 i RNA/ATP preklapaju dovele su do razvoja dva modela mehanizma izlaska mRNA iz

jezgre u citoplazmu. Preklapanje ovih veznih mjesta upu uje na to da vezanje Dbp5 na Nup159 uzrokuje otpuštanje ATP-a i RNA iz svog veznog mjesta.

Prema prvom modelu (Sl. 8A) mRNP veže Dbp5 u jezgri te prilikom prolaska kroz NPC prvo stupa u interakciju s Gle1. Gle1 stimulira hidrolizu ATP-a, nastaje ADP vezano stanje Dbp5 koje potom uspješno uklanja proteine vezane na mRNP. Dbp5 se potom veže na Nup159 na citoplazmatskoj strani NPC-a. Na in na koji Dbp5 disocira s Nup159 i omogu uje transport novih mRNP je neobjašnjen.

Prema drugom modelu (Sl. 8B) Dbp5 je vezan za Nup159 na citoplazmatskoj strani NPC-a. Prilikom prolaska mRNP kroz NPC, Dbp5 disocira s Nup159, veže se na mRNA te stupa u interakciju s obližnjim Gle1. Gle1 stimulira hidrolizu ATP-a, te Dbp5 u ADP veznom stanju uklanja proteine asocirane s mRNA. mRNA odlazi u citoplazmu, a Dbp5 se ponovno veže na Nup159 ili tako er disocira u citoplazmu (Ling i Song, 2010).



Slika 8. Medeli mehanizma transporta mRNA iz jezgre u citoplazmu posredstvom RNA helikaze Dbp5 (kod kvasca)
(prilago eno na temelju Ling i Song, 2010)

6. LITERATURA

- Jankowsky E, 2011. RNA Helicases at work: binding and rearranging. *Trends in Biochemical Sciences* **36**, 19-29.
- Jarmoskaite I, Russell R, 2011. DEAD-box proteins as RNA helicases and chaperones. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **2**, 135-152.
- Linder P, Jankowsky E, 2011. From unwinding to clamping – the DEAD box RNA helicase family. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **12**, 505-516.
- Ling SH, Song H, 2010. Mechanistic insights into mRNA export through structures of Dbp5. *RNA Biology* **7**, 23-27.
- Pan C, Russell R, 2010. Roles of DEAD-box proteins in RNA and RNP folding. *RNA biology* **7**, 667-676.
- Svitkin YV, Pause A, Haghighat A i suradnici, 2001. The requirement for eukaryotic initiation factor 4A (eIF4A) in translation is in direct proportion to the degree of mRNA 5' secondary structure. *RNA* **7**, 382-394.
- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6597/#_ncbi_dlg_citbx_NBK6597/
- <http://www.rnahelicase.org/>

7. SAŽETAK

RNA helikaze su visoko konzervirani enzimi prisutni u sve tri domene života te u nekim virusima. Uključeni su u sve korake RNA metabolizma od transkripcije do degradacije. Uspješno razdvajaju kraće dsRNA, RNA-DNA heteroduplekse, remodeliraju strukturu RNA te uklanjaju RNA iz RNP kompleksa. Sve te funkcije obavljaju u ovisnosti o vezanju i hidrolizi ATP-a.

U ovom radu detaljnije su opisane eukariotske RNA helikaze s DEAD domenom. Karakteristika svih je posjedovanje dvije RecA proteinu slične domene s RNA i ATP veznim mjestima u srži enzima. Na primjeru eIF4A i Dbp5 pokazano je kako ovi visoko konzervirani enzimi u suradnji s drugim proteinima mogu obavljati vrlo različite uloge kao što su inicijacija translacije te transport mRNA iz jezgre u citoplazmu.

8. SUMMARY

RNA helicases are highly conserved enzymes abundant in all three life domains and some viruses. These enzymes participate in all stages of RNA metabolism from transcription to degradation and are very effective in unwinding short dsRNAs, RNA-DNA heteroduplexes, remodeling RNA structure and removing RNAs from RNP complexes. All these functions are done in an ATP-dependent fashion.

In this work, eucaryotic DEAD box RNA helicases are described in detail. Characteristic of all DEAD box proteins are two RecA-like domains which harbour RNA and ATP binding sites. These highly conserved enzymes in cooperation with other proteins can perform different functions such as the initiation of translation (eIF4A) and mRNA transport from nucleus to cytoplasm (Dbp5).